

Bolsa Amadeus Dias/Universidade de Lisboa
Ano lectivo 2009/2010

Relatório Final de Projecto

Estudo da vascularização em válvulas cardíacas de indivíduos saudáveis através de imunocitoquímica direccionada para VEGFR-2

Aluno: David Alexandre Correia Coelho
Faculdade de Medicina 2º ano nº 10458

Tutora: Doutora Margarida Francisco

Enquadramento e Objectivos do trabalho:

Este Projecto de Investigação procurou explorar indícios de vascularização em válvulas aórticas cardíacas humanas saudáveis (não associados a causa de morte e morbilidade cardiovascular), procurando confirmar o pressuposto anatómico “clássico” de que as válvulas cardíacas normais são avasculares¹, face aos vários artigos de investigação que relatam a formação ou existência de vasos sanguíneos nas mesmas, em situações patológicas^{2,3}. Procurava-se assim esclarecer a relevância da presença destes vasos enquanto integrantes de mecanismos fisiopatológicos e não de estrutura normal.

Os Objectivos específicos são os seguintes:

- Explorar a existência de vasos sanguíneos até ao nível da microcirculação em válvulas aórticas cardíacas de indivíduos sem patologia valvular ou cardíaca, através de dissecção, preparação de lâminas histológicas e observação com hematoxilina-eosina e se possível anticorpos direccionados ao marcador vascular VEGFR-2 (*Vascular Endothelium Growth Factor Receptor 2*)

Métodos usados:

Foram obtidas duas válvulas cardíacas de porco, processadas e fixadas em formol e soluções sucessivas de álcool, xilol e incluídas em parafina. Foram depois efectuados cortes por micrótomo, coradas com hematoxilina e eosina e observadas para avaliação da qualidade dos cortes e facilidade de observação de estruturas vasculares.

Tendo os resultados obtidos sido satisfatórios foram repetidos os procedimentos para uma válvula aórtica humana, obtida por dissecção de um proveniente de autópsia de um indivíduo do sexo masculino, entre os 30 e 35 anos, sem indícios ou história de patologia cardiovascular, valvular ou outra. Obtendo-se 3 cortes em cada secção de 50 micrómetros, e estudando-se uma espessura total de 3,7 cm da válvula, 50 cortes foram ainda destinados a processamento com protocolo de imunohistoquímica, sendo o anticorpo primário direccionado para o marcadores endotelial vascular VEGFR-2.

Ambos os conjuntos de cortes histológicos foram analisados ao microscópio óptico, avaliando-se a qualidade do corte e a presença de vascularização no tecido valvular, reconhecido pela sua distribuição no corte, e constituição distinta do músculo cardíaco. A presença de vasos nos cortes de hematoxilina-eosina foi avaliada pela presença de morfologia histológica reconhecível compatível com estruturas vasculares, nomeadamente com estrutura endotelial definindo um lúmen bem delimitado e a presença de eritrócitos no seu interior. Os vasos foram classificados de acordo com a sua posição na válvula em 3 categorias:

¹ Duran, C. M. G. e Gunning, A. J. (1968)

² Chalajour F. et al (2007)

³ Soini Y. et al (2003)

- Na interface – na periferia da inserção da valva (folheto da válvula), simultaneamente em continuidade com o tecido valvular e com o miocárdio;
- No bordo aderente – inteiramente no tecido valvular, mas no intervalo desde o limite valvular até 1 mm deste (na direcção do bordo livre);
- Na válvula propriamente dita – inteiramente no tecido valvular e a mais de 1 mm do seu bordo aderente;

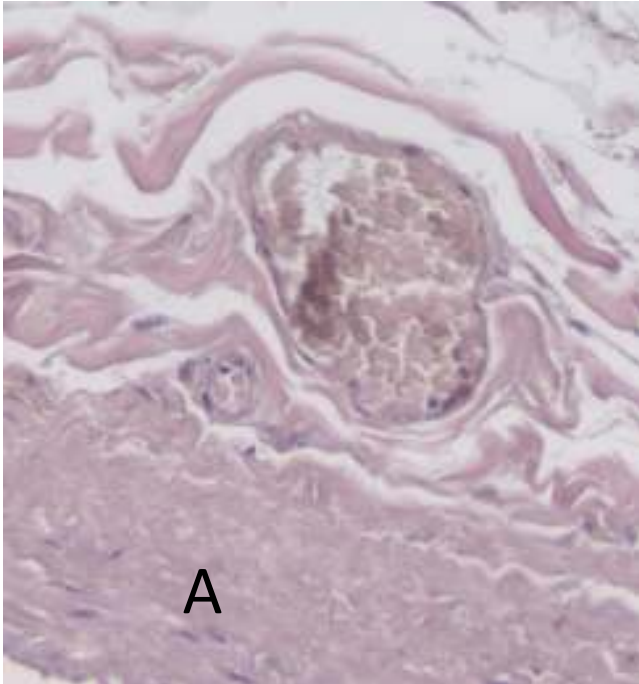


Fig. 1 – vasos na interface (100x)
A – válvula (bordo aderente)

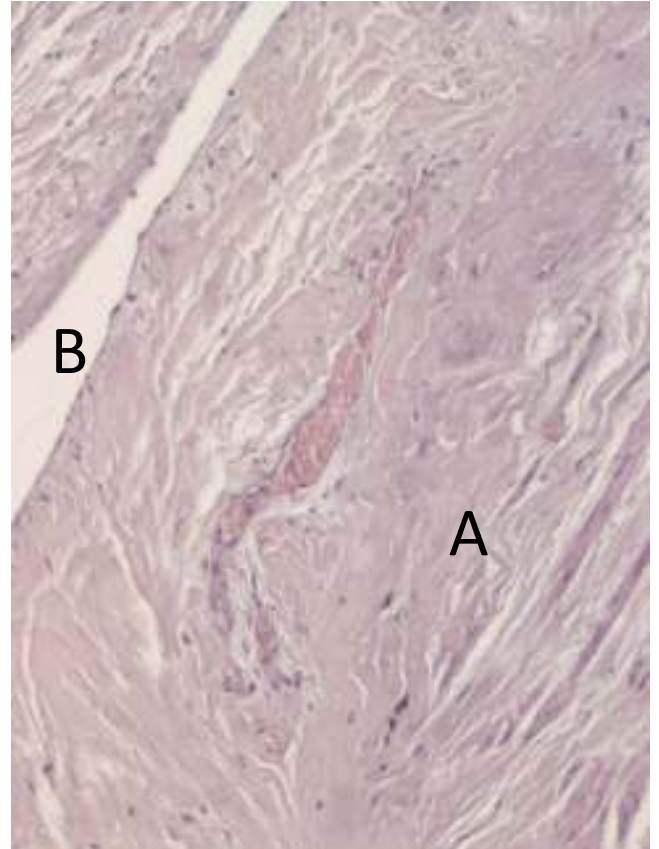


Fig. 2 – vasos no bordo aderente (50x)
A – interface músculo/válvula
B – dobra da válvula

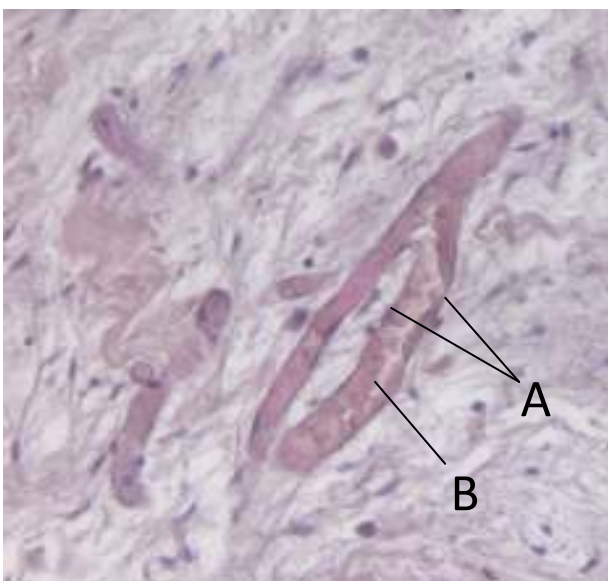


Fig.1 – vasos na válvula propriamente dita (200x)
A – endotélio
B – eritrócitos no lúmen vascular

Resultados:

Dentro dos 50 cortes corados com hematoxilina-eosina avaliados, foram encontrados vasos dentro de algum dos parâmetros já especificados em 44 dos 50 cortes, na sua maioria vasos de pequenas dimensões, ocasionalmente de maiores dimensões ou capilares. Os tipos de vasos encontrados foram os seguintes:

- Vasos na interface – presentes em 28 dos 50 cortes;
- Vasos no bordo aderente – presentes em 38 dos 50 cortes;
- Vasos na válvula propriamente dita – presentes em 21 dos 50 cortes;

É ainda de referir que os vasos encontrados na válvula propriamente dita foram encontrados sobretudo nos cortes “médios” da espessura valvular estudada, e menos nos que cortavam mais tangencialmente a superfície.

Os cortes avaliados por imunohistoquímica revelaram resultados inconclusivos, com coloração inespecífica, sem sensibilidade ou especificidade suficiente de coloração dos tecidos na detecção de estruturas vasculares, tendo sido realizados diversos testes procurando otimizar os resultados (variação dos tempos de incubação dos anticorpos, concentração dos mesmos, técnicas de “antigen-retrieval” e variação de técnicas de bloqueio de coloração inespecífica) sem resultado. A possibilidade de um problema com o anticorpo primário, foi excluída por utilização de nova alíquota, proveniente de um lote alternativo. Inclusive utilizando um anticorpo secundário alternativo de largo espectro, fornecido pelo Instituto de Anatomia, os resultados mantiveram-se.

Discussão dos resultados:

Os resultados de imunohistoquímica obtidos mesmo após tentativas de otimizar as variáveis laboratoriais e utilizando anticorpos primário e secundário alternativos, a presença de grandes vasos não corados no epicárdio, e tendo em conta que o material obtido é proveniente de autópsia humana⁴, o mais provável terá sido a degradação dos antígenos do tecido.

A presença mais frequente de vasos no bordo aderente seria compatível com um padrão de vascularização proveniente do bordo aderente, que se estenderia em direcção ao bordo livre com cada vez menores vasos e de menor calibre. De igual modo, a maior frequência encontrada nos “cortes médios” e menor nos cortes tangenciais indica uma possível localização preferencial dos vasos na espessura da válvula, possivelmente na sua camada média, “*spongiosa*” (em oposição à *fibrosa* e *ventricularis*), que desempenha in vivo um papel de “absorção de choque”⁵.

Os achados encontrados indicam claramente a presença de vasos nas valvas do espécimen estudado, no entanto são de ressaltar certas limitações do estudo: a amostra

⁴ Revisões nos últimos anos à legislação revelaram que não existe impedimento legal à realização imediata da autópsia após confirmação da morte, no entanto continua a ser comum um tradicional período mínimo de 24 horas antes da mesma, levando a uma certa degeneração tecidual (*ver bibliografia para legislação referente*)

⁵ Ross M.H. e Pawlina W. (2006)

muito reduzida (1 espécimen) e logo incapacidade de concluir sobre sua representatividade e análise estatística dos dados obtidos. As limitações da abordagem por imunohistoquímica resultaram também numa menor sensibilidade na detecção de vasos, podendo levar à subestimação do seu número, bem como dificultando a sua caracterização e da sua posição preferencial.

Conclusões e perspectivas futuras:

Os dados obtidos indicam claramente a presença de vascularização na válvula estudada, detectável ao microscópio óptico e sendo esta proveniente de um indivíduo saudável sem história ou sinais de patologia cardiovascular. Assim, este trabalho indica a necessidade de estudar uma maior amostra, representativa, em relação à vascularização das válvulas cardíacas, neste caso a aórtica, e esclarecimento se este é afinal um achado isolado, se a micro-vascularização valvular é fisiológica, ou se progride ao longo da vida. Isto será importante no esclarecimento do papel da vascularização e neo-vascularização em processos fisiopatológicos de válvulas cardíacas humanas.

Para um estudo mais preciso e conclusivo seria importante realizar com sucesso uma coloração imunohistoquímica, permitindo inclusive uma maior caracterização dos vasos em relação a certos parâmetros, como activação inflamatória, marcadores de neo-vascularização, ou outros. Abordagens possíveis seria a realização de estudos enfatizando a realização célere a conservação de material de autópsia; a obtenção de material valvular “in vivo” directamente de cirurgias (por exemplo tecido removido em valvuloplastias); e o estudo em modelos animais, permitindo estes últimos inclusive estudos futuros mais aprofundados com manipulação farmacológica e pesquisa de variáveis que influenciassem a vascularização valvular.

Se os resultados obtidos forem confirmados por estudos posteriores poderia haver relevância em melhor caracterizar a constituição destas e outras estruturas, por exemplo as cordas tendíneas do coração, em relação à presença de estruturas nervosas e linfáticas, tendo em conta a crescente noção da dinâmica destas estruturas e o seu envolvimento em patologias altamente relevantes nas sociedades industrializadas actuais.

Suporte escolhido de apresentação do projecto: PowerPoint

Bibliografia:

Chalajour, F., Treede, H., Gehling, U.M., Ebrahimnejad, A., Boehm, D.H., Riemer, R.K., Ergun, S. e Reichenspurner, H. (2007). Identification and characterization of cells with high angiogenic potential and transitional phenotype in calcific aortic valve. *Experimental Cell research*. 313, 2326-2335

Duran, C. M. G. e Gunning, A. J. (1968). The Vascularization of the Heart Valves: A Comparative Study. *Cardiovasc Res* 2(3): 290-296

Ross M.H e Pawlina W. (2006) *Histology: A text and Atlas*. 5ª edição, Lippincott Williams & Williams. Philadelphia.

Soini Y., Salo T. e Satta S. (2003) Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Human Pathology*. vol 34, nº 8

Lei n.º 45/2004, de 19 de Agosto - REGIME JURÍDICO DAS PERÍCIAS MÉDICO-LEGAIS E FORENSES (in Diário da República)